

Siège social

3600, boul Casavant Ouest
Saint-Hyacinthe, Qc, J2S 8E3
Tel : (450) 773-1105
Fax : (450) 773-8461

Bureau de Québec

1665, boul Hamel edifice 2
Local 1.06 Québec, Qc, G1N 3Y7
Tel : (418) 643-8903
Fax : (418) 643-8350

Projet de recherche : Rapport final

PRODUCTION DE POLYSACCHARIDES MICROBIENS SUR DES MILIEUX GLUCIDIQUES EN SURPLUS AU QUEBEC

Chargée de projet: Monique Racine
Campus Haute-Technologie Agro-Alimentaire de
Saint-Hyacinthe

Superviseur Johanne Dumont
Centre ACER Inc.

André Morin
Centre de recherche et de développement sur les aliments



Résumé

Le but de ce projet était d'explorer les possibilités afin de découvrir un nouveau polysaccharide alimentaire en utilisant les sources glucidiques en excès au Québec. Le projet a été réalisé en deux volets. Dans un premier temps, l'étude a porté sur la production de polysaccharides sur milieu à base de lactosérum déprotéiné avec des souches de collection déjà reconnues pour leur propriétés filantes et capables de métaboliser le lactose. Dans un deuxième temps, un criblage a été effectué afin de sélectionner un organisme capable d'épaissir le milieu à base de sirop d'érable déclassé. Pour les deux types de polymères, une optimisation des conditions chimiques, physiques et nutritionnelles du milieu a été menée afin d'accroître au maximum la production. Après isolement et purification, les polymères ont été analysés pour leur composition en monosaccharides et leur masse moléculaire. Une analyse globale de la fraction précipitable à l'alcool contenant le polysaccharide a été conduite dans le but de déterminer le pourcentage de protéines, de sucres, de cendres et d'humidité pour chacune des fractions précipitables et solubles à l'eau.

The aim of this projet was to investigate the possibility to discover a new food grade polysaccharide when using growth media based with carbohydrate source in excess in Québec. The projet was carried out in two steps. First, the production of polysaccharide by slimy well-known microorganisms able to metabolise lactose was studied on deproteinated whey based media. Secondly, a screening was performed with the purpose of choosing a microorganism able of thickening none commercialy viable maple sirup based media. An optimisation of the chemical, physical and nutritionnal conditions of the media was performed on both polymers in order to enhance the production to the maximum. The two polymers were analysed for their monosaccharides composition and their molecular weight next to isolation and purification. A global analysis of the alcool precipitable polysaccharide containing fraction was conducted with the intention of establishing the protein, sugar, ash and moisty percentage on each water soluble and insoluble fractions.

Note au document :

Le présent document est une réimpression d'un document publié il y a maintenant plusieurs années. Le lecteur devrait donc être indulgent quant à la qualité d'édition de certaines figures. Nous croyons cependant que ce document demeurent pertinents et justifient sa publication.



Table des matières

Première partie	5
Résumé	5
Objectifs du projet	5
Hypothèse	5
Protocole expérimental	6
Microorganisme	6
Milieux	6
Appareil et procédés de fermentation	6
Mesure de viscosité et analyse quantitative du lactose	7
Extraction et purification du polysaccharide	7
Analyses du polysaccharide	7
Résultats et discussion	8
Production et rendement	8
Effet du lactose	8
Effet de la température	10
Effet du chlorure d'ammonium	10
Effet du rapport C/N sur la production	11
Biomasse	12
Effet du pH	12
Effet du phosphate	12
Caractérisation du polysaccharide obtenu	13
Conclusion	13
Deuxième partie	14
Résumé	14
Hypothèse	14
Objectif	14
Protocole expérimental	15
Criblage	15
Microorganisme	15

Milieux	15
Procédés de fermentation	16
Purification	16
Analyses	17
Analyse du milieu dans les conditions optimales de production.....	17
Hydrolyse	17
Résultats et discussion.....	17
Sélection d'une souche et identification	17
Effet du saccharose et de l'extrait de levure	18
Effet du rapport C/N.....	19
Effet de la température	20
Effet du pH.....	20
Effet de la colonie	21
Effet de l'agitation	21
Rendement.....	22
Caractérisation du polysaccharide obtenu.....	24
Impacts scientifiques et économiques	24
Publication de l'auteur	25
Conclusion.....	25
Remerciements	25
Bibliographie Partie 1.....	26
Bibliographie Partie 2.....	27

Production de polysaccharides microbiens sur des milieux glucidiques en surplus au Québec.



Première partie

Conditions de production et caractérisation du polysaccharide extracellulaire par *Propionibacterium acidi propionici* sur lactosérum.



Résumé

Propionibacterium acidi propionici a produit 10 à 17 g.l⁻¹ d'un exopolysaccharide sur un milieu à base de lactosérum déprotéiné dans les conditions optimales où 60 g.l⁻¹ de lactose, 0.25 g.l⁻¹ de NH₄Cl et 6.0 g.l⁻¹ de KH₂PO₄.2H₂O étaient ajoutés au milieu ajusté à pH 7.0, incubé à 25°C, 60 à 100 heures. La viscosité finale des milieux est demeurée inférieure à 20 cps.

Les principaux constituants du polymère identifiés ont été le glucose, le galactose, un 5-méthylpentose et l'acide uronique dans une proportion de 8 à 10%. La masse moléculaire de l'exopolysaccharide était inférieure à 5800 daltons.



Objectifs du projet

Notre travail visait à établir l'effet de la teneur en lactose, en phosphate et en chlorure d'ammonium sur la production du polysaccharide, de même que l'effet du pH et de la température. Nous rapportons également les propriétés rhéologiques des milieux fermentés ainsi qu'une caractérisation chimique du polysaccharide.



Hypothèse

La production de polysaccharides microbiens, a été envisagée comme moyen de revaloriser le lactosérum. L'intérêt des polysaccharides du point de vue alimentaire réside dans le fait qu'ils ont la propriété d'épaissir, de stabiliser et de gélifier une solution et cela à faible concentration (Maury et Roque, 1986). Parmi plusieurs travaux démontrant la capacité de certains microorganismes à épaissir leur milieu de culture, l'étude de Reddy et coll.,(1973) a démontré que *Propionibacterium* produisait du polysaccharide sur un milieu à base de glucose. Plus récemment, Crow (1988) démontrait que *P. acidi propionici* pouvait également produire du polysaccharide sur un milieu à base de lactosérum de type présure supplémenté avec de l'extrait de levure. Le polymère était constitué d'une chaîne de glucose, galactose et d'un

méthylpentose. Toutefois, aucun travail d'optimisation de la production du polysaccharide n'a été effectué sur un tel milieu. Nous avons donc entrepris d'élucider les conditions qui permettraient d'optimiser la production.



Protocole expérimental

Microorganisme

La souche utilisée, *propionibacterium acidi propionici* VM-25 fait partie de la collection du Centre de recherches et de développement sur les aliments de St-Hyacinthe, Qué., Canada. La souche était maintenue sur milieu au lactate de sodium (LS) à 4°C (Champagne et coll., 1989). Les repiquages se faisaient une fois par mois, en transférant une anse de l'ancienne culture et en l'incubant à 32°C pendant 48 à 72 heures.

Milieux

Le milieu de production était constitué à partir d'une poudre de lactosérum doux de mozzarella de Saputo, réhydratée à un taux de 3% (p/v). Après avoir ajusté le pH à 5.0 avec du HCl 1.0 N, le milieu était autoclavé en volume de 2L, à 121°C pendant 15 min, pour provoquer la précipitation d'une partie des protéines du lactosérum, limitant ainsi la quantité d'azote disponible dans le milieu (Shams et Jaynes, 1983). Le précipité était enlevé par filtration sous vide avec une membrane de type rapide. Le lactosérum partiellement déprotéiné était alors enrichi avec 2.0 g.l⁻¹ KH₂PO₄ et 0.25 g.l⁻¹ NH₄Cl. Le lactose était ajouté à raison de 60 g.l⁻¹ pour tous les essais sauf pour l'essai faisant varier le lactose. Le pH du milieu était réajusté au besoin à 5.0 avant la deuxième stérilisation (121°C, 15 min.). Une solution de sels stérilisée par filtration sur membrane Millipore (0.22 µm) était ensuite ajoutée à raison de 4 ml.l⁻¹ de milieu. Le milieu complet était ramené à la neutralité avec NaOH 2N. Pour les études spécifiques de conditions nutritionnelles, le milieu de base était supplémenté en lactose de 20 à 100 g.l⁻¹, NH₄Cl de 0 à 1.0 g.l⁻¹ et KH₂PO₄ 0 à 6.0 g.l⁻¹ alors que l'effet des conditions physiques et chimiques ont été mesurées en faisant varier la température de 20 à 30°C et le pH de 5.0 à 6.5.

Appareil et procédés de fermentation

Un bouillon de 250 ml de LS stérile étaitensemencé dans un erlenmeyer de culture et incubé à 32°C pendant 48 à 72 heures. La fermentation était réalisée dans un fermenteur de type Braun, Biostat M d'une capacité de 2L. Un inoculum de 6% (v/v) était ajouté à 1.5 L du milieu à base de lactosérum. La température était maintenue à 25°C et l'agitation à 70 rpm sans aération ni ajout d'antimousse. A la fin de la fermentation, le milieu entier était conservé congelé à -18°C afin d'en extraire ultérieurement le polysaccharide pour fins d'analyses chimiques et physiques.

Un échantillon en duplicata était prélevé dans des conditions stériles à intervalles réguliers tout au long de la fermentation, pour fins d'analyses sur le rendement en polysaccharides.

Le rendement en exopolysaccharides était évalué en centrifugeant 2 aliquots de 10 ml à 13 000 rpm, 30 min., 4°C à l'aide d'une centrifugeuse modèle Sorvall RC 5B, rotor SS 34. Le surnageant était recueilli puis précipité avec 2 à 3 volumes d'éthanol 95% refroidi à 4°C (Smith et Pace, 1982). Le précipité était filtré sous vide sur papier Whatman type GF/A puis séché au four à vide sur une période de 15 heures à

45°C sous un vide de 630 mm de mercure. Le culot servant à la détermination de la biomasse était séché dans les mêmes conditions.

Mesure de viscosité et analyse quantitative du lactose

La viscosité finale du milieu était mesurée sur un viscosimètre Brookfield modèle LVTDVII muni d'un adaptateur pour échantillon à petit volume et d'une jaquette reliée à un bain thermostaté Brookfield EX-200. Les mesures ont été prises avec une aiguille SC4-18 à 60 rpm et 25°C. Le temps de stabilisation avant la lecture était de 30 secondes.

L'évaluation de la quantité finale du lactose a été menée par comparaison du temps de rétention d'un échantillon traité provenant du milieu de fermentation avec un étalon de lactose en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). L'analyse était réalisée sur une colonne de type Sugar-Pak1 de Waters éluée avec une phase mobile constituée d'eau ultrapure additionnée de 50 mg de sel monocalcique et dissodique d'acide éthylènediamine tétracétique (EDTA). La température était maintenue à 90°C et le débit à 0.5 ml.min⁻¹. La détection était effectuée à l'aide d'un détecteur à indice de réfraction différentiel Waters 410.

Extraction et purification du polysaccharide

Le milieu de fermentation était centrifugé à 6000 rpm, 30 min à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse modèle Sorvall RC 5B, rotor GSA. Le surnageant était précipité avec 2 à 3 volumes d'éthanol 95% refroidi à 4°C. Le précipité était recueilli en l'entourant autour d'une tige de verre ou en centrifugeant à 6000 rpm, 15 min à 4°C. Le culot était dissous dans de l'eau ultrapure et resuspendu à 500 tours/min, 45 à 60 min à l'aide d'un agitateur modèle Camafro RZR50 muni d'une pale asymétrique perforée. Ces opérations ont été répétées à 2 reprises afin d'augmenter le degré de pureté. Ensuite, le polysaccharide était redissous dans de l'eau ultrapure, lyophilisé 48 à 72 heures, puis réduit en poudre à l'aide d'un broyeur Cyclotech 1093.

Les sels minéraux et l'excédant de lactose étaient éliminés par diafiltration contre de l'eau ultrapure avec les microconcentrateurs de Amicon, Centricon 3, sur la centrifugeuse Sorvall RC 5B, rotor SS 34 munie d'adaptateurs de caoutchouc Corning 8441. La diafiltration était réalisée à 6500 rpm, 120 min à 20°C. Deux autres centrifugations successives étaient réalisées dans les mêmes conditions après avoir réajusté à la limite supérieure, le niveau d'eau du réservoir de l'échantillon. Le rétentat était récupéré et conservé dans les gobelets fermés. Le seuil de coupure de 3000 daltons permettait l'élimination simultanée des sucres de faible masse moléculaire et des sels.

Analyses du polysaccharide

Le contenu en acide uronique a été déterminé par une réaction colorimétrique au carbazole développée par Dische en 1947 et améliorée par Bitter et Muir (1962) et Knuston et Jeanes (1968) par l'ajout du borate dans l'acide sulfurique concentré. L'absorbance était mesurée à 530 nm sur un spectrophotomètre Beckman DU-7 et comparée à une courbe standard de glucuronolactone dans de l'eau ultrapure, saturée avec de l'acide benzoïque.

L'hydrolyse du polysaccharide conduisant à l'identification des monosaccharides s'est poursuivie sur une période de 4 heures à 100°C. Un volume de 2 ml de H₂SO₄ 2N a été ajouté à 10 à 20 mg de polysaccharides séchés et purifiés. L'hydrolysate a été neutralisé avec de l'hydroxyde de barium (Grabner et coll., 1988) puis centrifugé à 3500 rpm, 10 min. Le surnageant a été filtré sur membrane de 45 µm. Le volume d'hydrolysate a été réduit 3 à 4 fois par évaporation sous vide à 50°C, 7 heures.

L'identification des monosaccharides constituant le polysaccharide a été réalisée par chromatographie sur couche mince (Morin et coll., 1987). Un volume de 20 µl de l'hydrolysate a été déposé sur une plaque Kiesgel 60 (Whatman) éluée avec acétone:butanol:eau (4:5:1). Les plaques ont été vaporisées avec un révélateur composé de 10 parties de dihydroxy-1,3-naphtalène 0.2% dissous dans le méthanol pour une partie d'acide phosphorique (85%) et chauffées à 100-110°C.

La présence de méthylpentose a été détectée par la méthode de Dische et Shettles,(1948).

La masse moléculaire du polysaccharide a été évaluée par filtration sur gel à l'aide d'un système CLHP muni de 2 colonnes Ultrahydrogel de Waters placées en série. Les colonnes ont été maintenues à 45°C pour un débit de 0.8 ml.min⁻¹. Les échantillons étaient préalablement déminéralisés puis filtrés sur 0.22 µm avant d'être injectés. La courbe standard a été établie à l'aide de l'ensemble de calibrage de polysaccharides disponible chez Polymer Laboratories Ltd.



Résultats et discussion

Production et rendement

La croissance de bactéries propioniques sur un milieu à base de lactosérum est lente et exige parfois 7 jours (Buderman et Berry, 1986). Cet inconvénient a été partiellement comblé par une inoculation importante. Malgré le fait qu'elle pourrait être raccourcie davantage en substituant le lactate au lactose comme source de carbone (Champagne et coll., 1989), il est probable qu'il en aurait résulté une teneur réduite en polysaccharides. L'effet positif d'addition de lactose tend à supporter cette hypothèse. Nous avons constaté que la production débutait généralement lentement après 20 à 40 heures de fermentation pour atteindre un plateau après 100 heures. Sa poursuite au delà de 120 heures ne semblait pas stimuler un accroissement de production. A l'occasion, certaines courbes affichaient une baisse en fin de fermentation. Ce phénomène pourrait être causé par l'hydrolyse du polymère (Cerning et coll., 1988) en oligosaccharides ou sucres simples dû à la présence d'une glucosidase. La plus grande partie de la production est cependant obtenue à la fin de la croissance des cellules lorsque l'azote épuisé devient un facteur limitant (Duiguid et Wilkinson., 1953). Le rendement en exopolysaccharides obtenu dans les conditions optimum de production était situé entre 10 et 17 g.l⁻¹.

Effet du lactose

L'utilisation modérée de la source de carbone jumelée à un rendement élevé en exopolysaccharides conduisent à des taux de conversion (tabl.1) élevés, signe de l'efficacité de la transformation du lactose en polysaccharides. Les meilleurs taux de conversion observés ont été généralement obtenus alors que les conditions favorisaient les plus hauts rendements en exopolysaccharides. Simultanément, nous avons constaté que la meilleure production a été obtenue alors que le milieu était supplémenté avec 60 g.l⁻¹ de lactose (fig.1). De plus, la viscosité du milieu était la plus élevée avec 17.0 cps (tabl.1). Malgré que la présence excessive de lactose (80 g.l⁻¹) ait stimulé la production du polymère, une grande proportion du lactose demeure inutilisée à la fin de la fermentation (tab.1).

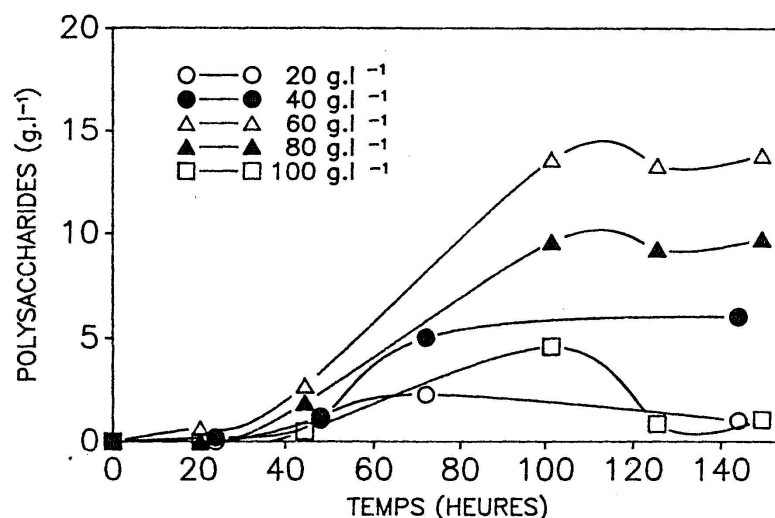


Figure 1 Effet de la concentration du lactose sur la production de polysaccharide par *Propionibacterium Acidi Propionici* au cours de la fermentation.

Tableau 1. Effets de différents paramètres (concentration en lactose, NH_4Cl , KH_2PO_4 , température et pH) sur l'évaluation finale de la viscosité, de la biomasse, de la concentration en lactose non-utilisé et du taux de conversion du lactose en polysaccharides.

Éléments variables	Quantité ajoutée	Viscosité cps	Biomasse g.l^{-1}	¹ lactose résiduel g.l^{-1}	² Taux de conversion %
Lactose	20 g.l^{-1}	3.8	1.4	19.6	11.3
	40	8.1	5.5	36.1	26.1
	60	17.0	7.8	56.1	57.8
	80	13.5	7.5	66.6	29.3
	100	4.3	2.8	75.2	10.3
NH_4Cl	0.00 g.l^{-1}	4.3	3.3	62.4	23.1
	0.25	3.6	2.8	46.2	31.5
	0.50	3.6	2.4	65.8	31.9
	1.00	3.4	2.6	49.3	21.9
KH_2PO_4	0.0 g.l^{-1}	3.5	5.3	57.3	10.7
	2.0	6.3	6.3	60.7	32.1
	4.0	1.9	4.4	62.4	40.7
	6.0	2.9	5.8	64.7	69.8
$\text{T } ^\circ\text{C}$	20	³ N.D.	2.0	64.6	42.4
	25	N.D.	3.2	59.6	47.3
	30	N.D.	2.3	43.4	11.0
	35	N.D.	4.6	52.7	20.6
pH	5.0	2.6	2.1	56.4	15.4
	5.5	3.7	2.6	55.3	55.3
	6.0	5.2	2.9	45.8	52.4
	6.5	4.1	3.0	44.1	40.3

1 Le lactose résiduel a été déterminé par CLHP

2 Le taux de conversion est donné par le rapport de la quantité optimum de polysaccharides produits sur la quantité de lactose utilisé (finale).

3 Non disponible.

Effet de la température

Il avait déjà été observé que la température avait un effet sur le rendement en exopolysaccharides (Duguid et Wilkinson, 1953; Williams et Wimpenny, 1977; Graber et coll., 1988), nous avons trouvé une meilleure production à une température légèrement inférieure à la température optimale de croissance soit 25°C (fig.2). Cet effet a déjà été vérifié, (Congregado et coll., 1985; Manresa et coll., 1987). Cependant les motifs expliquant ce changement ne semblent pas connus.

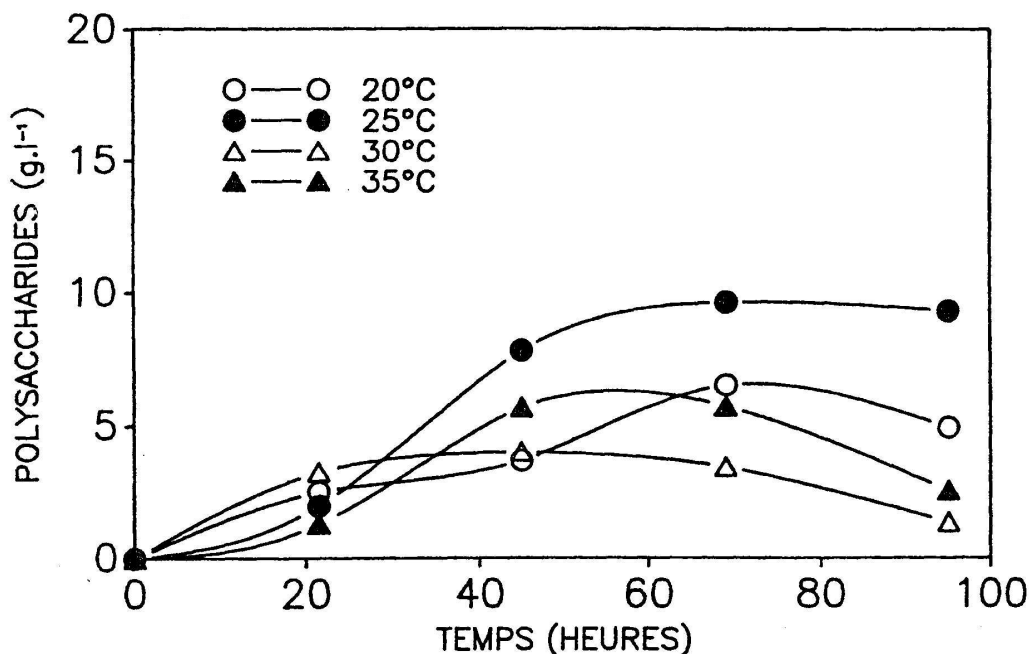


Figure 2 Influence de la température sur la production de polysaccharide par *Propionibacterium Acidipropionici* au cours de la fermentation.

Effet du chlorure d'ammonium

Le contenu en chlorure d'ammonium était considéré comme la seule source d'azote disponible dans le milieu suite au traitement de précipitation des protéines du lactosérum. Une analyse sur Kjeldahl nous a révélé que la quantité d'azote organique présente après précipitation était négligeable ($< 0.03\%$). Plusieurs auteurs ont démontré que le rendement en polysaccharides extracellulaires augmentait lorsque le milieu était pauvre en azote et riche en carbone (Williams et Wimpenny, 1977; Duguid et Wilkinson, 1984; Congregado, 1985). Nos résultats sont en accord avec cet observation, puisque le rendement en polysaccharide est optimum à une concentration de 0.25 g.l^{-1} de chlorure d'ammonium alors que le lactose était en excès et que le rapport C/N était de 514 (fig.3).

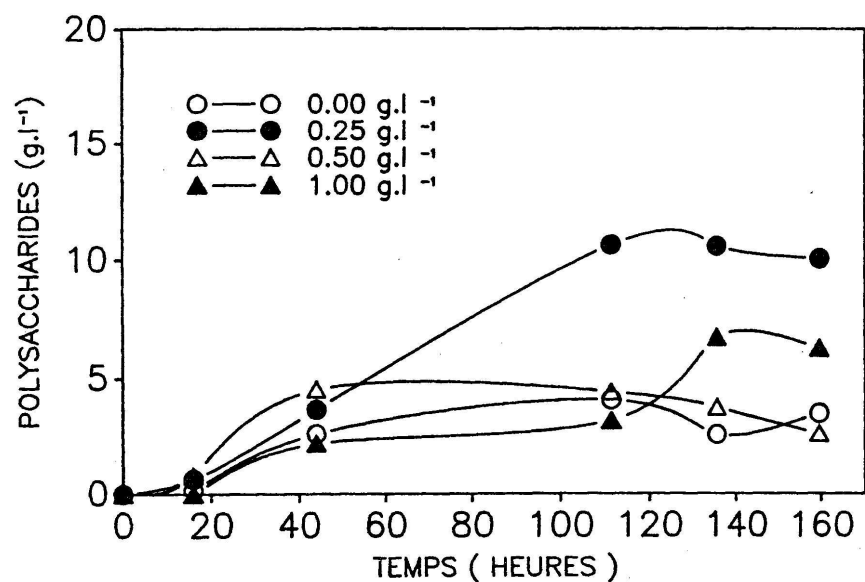


Figure 3 Effet du chlorure d'ammonium sur la production de polysaccharide par *Propionibacterium Acidipropionici* au cours de la fermentation.

Tableau 2 Rapport C/N calculé sur le rendement maximum en exopolysaccharides pour les essais faisant varier la quantité de lactose et de chlorure d'ammonium.

Variables	Quantité ajoutée g.l ⁻¹	Rapport C/N	Rendement en polysaccharides g.l ⁻¹
Lactose ¹	20	257	2.29
	40	385	6.06
	60	514	13.83
	80	643	9.77
	100	773	4.62
NH ₄ Cl ²	1.00	129	6.73
	0.75	385	4.53
	0.25	514	10.65
	0.00	³ N.D.00 ∞	4.07

1. La quantité en NH₄Cl est fixée à 0.25 g.l⁻¹.

2. La quantité en lactose ajoutée est fixée à 60 g.l⁻¹.

3. Non déterminé

Effet du rapport C/N sur la production

L'effet du carbone et de l'azote sur la production peut être traduit en un rapport C/N. Les résultats au tabl.2 tendent à démontrer qu'un rapport élevé favorise la production de polysaccharides. Plusieurs auteurs s'entendent à défendre la même hypothèse mais peu d'entre eux publient leur rapport optimum (Duguid et Wilkinson, 1953; William et Wimpenny, 1977; Graber, 1988). Congregado, (1985) démontrait un rapport C/N=40, lors d'un ouvrage avec certaines espèces de *Pseudomonas*. En ce qui concerne

Propionibacterium acidi propionici, nos résultats ne se rapprochent pas de la littérature disponible avec un rapport C/N=514. La grande quantité de lactose ajoutée en plus de celle déjà contenue dans le lactosérum et la faible quantité d'azote présente contribuent à élever considérablement ce rapport.

Biomasse

La production en biomasse semblait subir les mêmes fluctuations que le rendement en polysaccharides lorsqu'elle était soumise aux différentes contraintes nutritionnelles et physiques (tabl.1). Cette observation découle du fait qu'un haut rendement en polymère s'accompagne généralement d'une augmentation de la taille des capsules (Duguid et Wilkinson, 1953). De plus, la séparation des cellules du surnageant devient plus ardue. Le polymère se lie plus fortement aux cellules et empêche la séparation nette. Un lavage adéquat des cellules pourrait être suggéré.

Effet du pH

L'importance du pH sur le rendement en polysaccharides de divers souches a été décrite par de nombreux auteurs (Congregado, 1985; William et Wilkinson, 1977; Graber et coll., 1988). Un pH initial plus élevé favorise la production et la croissance bactérienne. Lorsque le pH n'est pas contrôlé, une addition adéquate de phosphate de potassium contribue à son maintien au dessus de 6.0, valeur sous laquelle la production est parfois compromise. Le pH optimisant la production du polymère dépend des espèces concernées mais le plus souvent il se situe autour de la neutralité. Nos expériences confirment ces ouvrages (fig.4).

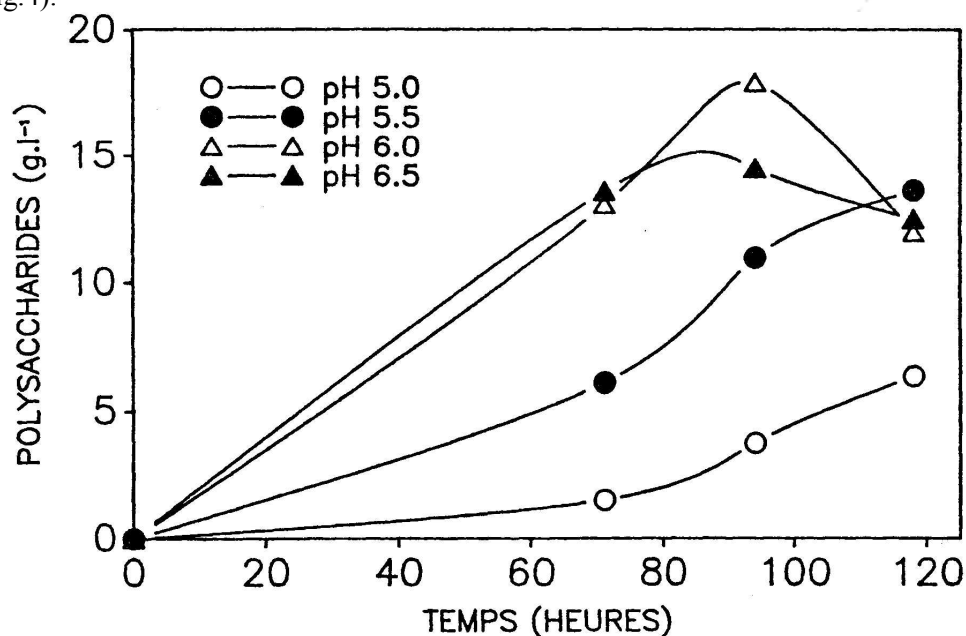


Figure 4 Influence du pH sur la production de polysaccharide par *Propionibacterium Acidi Propionici* au cours de la fermentation.

Effet du phosphate

Le phosphate exerce un effet sur le milieu surtout lorsqu'il sert de tampon (William et Wimpenny, 1977; Manresa et coll., 1987). Nos résultats semblent démontrer que le phosphate influence le rendement en exopolysaccharides bien que le pH du milieu soit maintenu près de la neutralité (fig.5). Le meilleur rendement a été obtenu pour 6.0 g.l⁻¹ de phosphate de potassium alors que l'absence de phosphate de potassium élimine presque toute production.

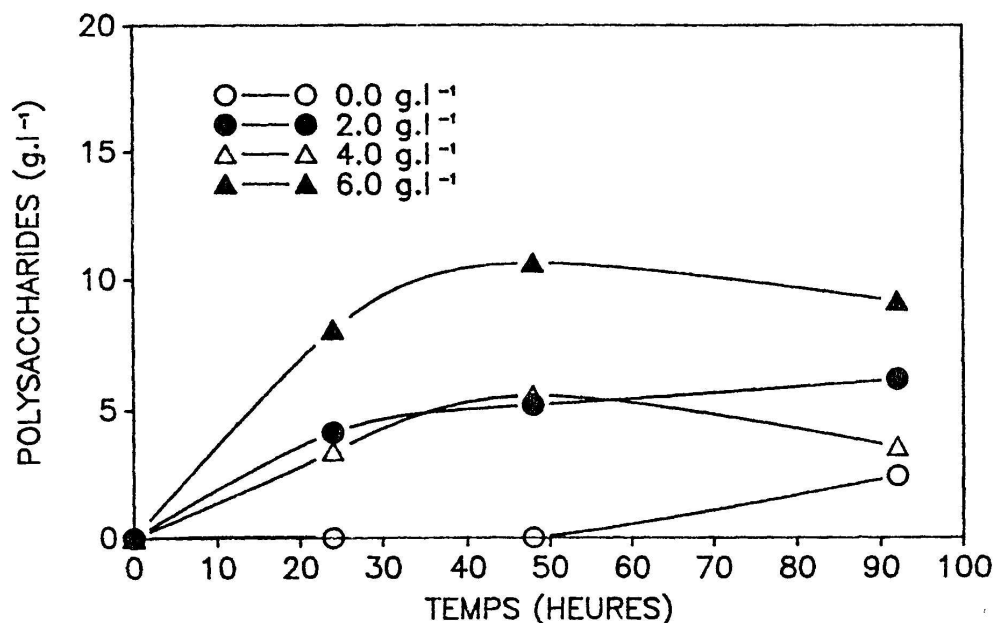


Figure 5 Effet du phosphate de potassium sur la production de polysaccharide par *Propionibacterium Acidi Propionici* sur lactosérum au cours de la fermentation.

Caractérisation du polysaccharide obtenu

Le contenu en acide uronique a été évalué entre 8 et 10% à partir d'une courbe étalon dont la corrélation linéaire était de $r=0.98$. Après hydrolyse, les principaux sucres identifiés ont été le glucose et le galactose. Un autre sucre, un méthylpentose, a été identifié (Crow, 1988), selon la méthode décrite par Dische, 1948. La masse moléculaire était inférieure à 5800 daltons correspondant à l'étalon de plus faible masse moléculaire constituant notre courbe de référence. D'après ces résultats nous sommes portés à croire que le polymère issu de PBAP aurait la taille d'un oligosaccharide. Comme la longueur du polysaccharide est un facteur qui influence son comportement rhéologique, ceci expliquerait en partie les faibles viscosités obtenues dans les milieux de fermentation alors que le rendement en polymère était très élevé.



Conclusion

Il a donc été possible de produire un polysaccharide dans du lactosérum à un taux de 10 à 17 g.l⁻¹ avec *Propionibacterium acidi propionici*. Le procédé donne également deux autres sous-produits de haute valeur : le concentré protéique de haute valeur nutritive issu du premier traitement thermique et un lactosérum fermenté contenant du propionate. Le premier pourrait être utilisé en fromagerie dans la fabrication du Ricotta ou réincorporé dans le lait de fabrication et le second en panification pour ses propriétés antifongiques (Champagne et coll., 1989). Après 6 mois d'entreposage à 4°C, le milieu de fermentation n'a pas sédimenté, maintenant les cellules en suspension ce qui confère au polysaccharide un potentiel de stabilisant à faible viscosité.



Deuxième partie

Conditions de production et caractérisation du polysaccharide extracellulaire par *Enterobacter agglomerans* sur milieu à base de sirop d'érable non commercialisable.



Résumé

Un criblage par sélection directe et indirecte à partir d'échantillons de feuilles et d'écorce d'érable, de terre d'érablière, de boues d'usine d'épuration des eaux et de sirop d'érable filant, a permis d'isoler 272 microorganismes sauvages susceptibles de pouvoir produire un polysaccharide sur un milieu à base de sirop d'érable non commercialisable. La bactérie retenue et identifiée comme étant *Enterobacter agglomerans* a démontré qu'elle pouvait produire dans de bonnes conditions de culture des viscosités moyennes de 2000 centipoises (cps) atteignant 3000 cps. Les meilleures viscosités ont été obtenues alors que 80 g/l de saccharose et 1,5 g/l de NH_4Cl dans un rapport C/N=168 étaient ajoutés au milieu ajusté à pH supérieur à 6.5 incubé à 30°C, à 250 rpm pendant 96 heures.

Les principaux constituants du polymère identifiés ont été le glucose et le galactose. La masse moléculaire de l'exopolysaccharide s'étendait de 500 000 à 200 millions de daltons.



Hypothèse

La production de filant a été observée dans les sirops d'érable (Conseil des productions végétales du Québec, 1984). Ce changement dans l'apparence du produit est provoqué par l'action de bactéries dans l'eau d'érable lorsque la température s'élève suffisamment pour permettre la croissance rapide et la production du polysaccharide. On a par le passé, attribué la responsabilité à une bactérie correspondant à *Aerobacter aerogenes* (Fabian et al., 1935). Aucun travail plus récent ne pouvait préciser ou confirmer ce premier auteur.



Objectif

Notre étude avait pour objectif d'isoler une souche sauvage pouvant produire un polymère sur un milieu à base de sirop d'érable et de procéder à son identification. Par la suite, une analyse sur les conditions de production a été menée ainsi qu'une caractérisation chimique du polymère isolé.



Protocole expérimental

Criblage

Le criblage a été réalisé par sélection directe et indirecte. Les sources de contamination utilisées ont été : la terre d'érablière, les feuilles et l'écorce d'érable, le sirop d'érable filant et les boues non traitées provenant d'une usine d'épuration des eaux. La collecte directe consistait en un lavage de la source avec 100 ml d'eau peptonnée stérile, suivie d'une dilution sur tube d'eau peptonnée 0.1% stérile. On pipettait un volume de 0.1 ml de chaque tube sur la surface des pétris. Les géloses contenant soit un milieu à base de sirop d'érable (SE), soit un milieu à base d'eau d'érable (EE), (voir la section sur les milieux pour la composition) étaient incubées à 10, 30 et 55°C pendant 2 à 5 jours selon la croissance observée. La collecte indirecte consistait à ensemencer 25 ml de milieu de culture liquide stérilisé dans des erlenmeyers de 250 ml, avec quelques grammes (environ 10) de la source et d'incuber plusieurs jours à 10, 30 et 55°C avec agitation à 200 rpm. On prélève 1 ml du bouillon à chaque jour, puis on procède à la dilution et la mise en petri sur milieux comme pour la sélection directe. De 3 à 10 colonies isolées étaient prélevées pour chaque traitement. Au total, 272 souches ont été repiquées sur tube de gélose nutritive. Après 24 à 72 heures de croissance aux températures respectives, les tubes ont été entreposés à 4°C puis réensemencés un à un dans 25 ml de milieu de culture stérilisé dans des erlenmeyers de 250 ml. Une première sélection des microorganismes filants a pu être effectuée en mesurant la viscosité finale de chaque milieu sur Brookfield modèle LVTDV-II après quatre jours de fermentation.

Microorganisme

Les colonies sélectionnées étaient conservées sur tubes de gélose nutritive inclinée à 4°C. Les repiquages se faisaient une fois par mois en transférant une anse des anciennes cultures et en les incubant à leur température respective. Les colonies pures ayant des propriétés filantes ont également été conservées sous état lyophilisé.

Milieux

Les milieux de production à base de SE et EE étaient constitués des éléments suivants :

Tableau 3. Liste des constituants du milieu initial à base de sirop et d'eau d'érable (1 litre).

Constituants	SE quantité (g)	EE quantité (g)
Sirop d'érable (66°Br)	30.3	nil
Eau d'érable (2°Br)	nil	1000 ml
K ₂ HPO ₄	9.0	9.0
KH ₂ PO ₄	3.0	3.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3	0.3
Extrait de levure	1.5	1.5
Agar (pour gélose)	12.0	12.0

Les milieux étaient préalablement fondus si nécessaire (agar) et stérilisés à l'autoclave à 121°C, 15 min. Seul le milieu à base de sirop d'érable (MBSE) a été conservé pour les études spécifiques des conditions nutritionnelles, physiques et chimiques de production du polysaccharide. Lors des essais, l'effet des conditions de production a été étudié en faisant varier successivement un paramètre tout en gardant les autres constants.

Tableau 4. liste des paramètres étudiés, de leur champs d'application et leur ordre d'étude.

Ordre	Paramètres	Étendue des paramètres
1	Saccharose	20, 40, 60, 80 et 100 g/l
2	source d'azote	NH ₄ Cl, extrait de levure caséine, extrait de boeuf
3	ext. de levure	0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0 et 10 g/l
4	rapport C/N	131, 164 et 218
5	température	15, 20, 25, 30 et 35°C
6	pH à 20, 25 et	5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 et 8.0 30°C
7	agitation	50, 100, 150, 200, 250 et 300 rpm

La meilleure réponse de chaque paramètre étudié a été conservée comme constante pour les études suivantes :

Procédés de fermentation

Un bouillon de 25ml de MBSE stérile était ensemencé à l'aide de 2 anses à inoculer de la colonie pure et fraîche (24 heures). Dans les conditions de base, le milieu était incubé pendant 4 jours à 30°C, pH 7.0 et 200 rpm. À la fin de la fermentation, une mesure de viscosité était prise sur le milieu à l'aide d'un viscosimètre Brookfield (voir 1^{ère} partie dans protocole expérimental). Les mesures étaient effectuées en duplicata ou en triplicata avec les aiguilles SC4-18, 24, 31 et 34.

Un contrôle global de la production du polysaccharide a été mené dans les conditions optimales déterminées. Le milieu de 25 ml a été inoculé à raison de 1 ml (4% v/v) d'inoculum dont l'absorbance mesurait 0.369 sur Spectronic 21 de Bausch & Lomb à une sensibilité médium. Ces essais ont été menés en quadruplicata dans des erlenmeyers de 250 ml. Chaque échantillon était soumis aux analyses une fois puis était jeté.

Purification

Pour analyse des sucres simples et de la masse moléculaire

Le milieu entier a été dilué 3 fois et centrifugé 2 heures, 13 000 g à 4°C dans une centrifugeuse modèle Sorvall rotor SS-34. Le surnageant a été recueilli et le culot resolubilisé et recentrifugé dans les mêmes conditions, 30 min. L'opération a été répétée une troisième fois et les surnageants recueillis, puis les trois fractions ont été combinées totalisant 160 ml du milieu initial. Les surnageants ont été précipités dans 2 à 5 volumes d'éthanol 95% à 4°C, puis resolubilisés dans de l'eau milli-Q et dialysés 3 fois en volume de 250 ml d'eau milli-Q à chaque fois, sous agitateur magnétique.

Analyses

La purification du polysaccharide a été réalisée en précipitant le milieu complet avec 3 à 5 volumes d'éthanol 95% à 4°C et en recueillant le précipité dans 4 volumes d'eau distillée, puis congelé et lyophilisé 48 heures.

Analyse du milieu dans les conditions optimales de production

La fraction précipitable à l'alcool a été évaluée en ajoutant 3 à 5 volumes d'éthanol 95%, 4°C à un échantillon de 5 à 10 g de milieu. Le précipité était recueilli et séché au four à vide à 40°C jusqu'à poids constant (app. 5 heures) puis pesé et reporté en g/l. L'utilisation du saccharose a été mesurée par détermination enzymatique du sucrose et glucose par U.V. (Mannheim Boehringer, sucrose/D-glucose, no. cat. 139 041) Le taux d'évaporation au cours de la fermentation a été mesuré par différence de masse entre la masse au temps donné et la masse au temps initial. La mesure de viscosité a été évaluée selon la méthode déjà décrite plus haut.

Hydrolyse

L'hydrolyse du polysaccharide conduisant à l'identification des monosaccharides s'est poursuivie sur une période de 18 heures à 100°C avec chauffage à reflux en présence d'acide sulfurique à une concentration finale de 2N. L'hydrolysate a été neutralisé avec de l'oxyde de baryum (BaOH), puis centrifugé pour récupérer le surnageant et le volume réduit à 75 ml sur évaporateur rotatif à 50°C et porté à 100 ml final. L'échantillon a été filtré sur Sep-Pak C-18 conditionné au méthanol et sur Sep-Pak Alumina A, suivi d'une filtration sur 0,45 µm. Les sucres simples ont été identifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) à l'aide d'une pompe Waters 712 WISP et d'un détecteur à indice de réfraction différentiel Waters 410. La colonne de type Sugar-Pak1 était chauffée à 90°C et éluée avec une solution de sels monocalcique et dissodique d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) 50 mg/l à un débit de 0.5 ml/min. L'atténuation était à 64, la sensibilité à 16 et le "scale factor" à 20. Une deuxième analyse a été réalisée sur le même système CLHP avec une colonne LC-NH2 afin de séparer le rhamnose du galactose. La colonne chauffée à 25°C était éluée avec une phase mobile (75% acétonitrile et 25% eau milli-Q) à un débit de 1 ml/min pour une atténuation de 64, une sensibilité de 16 et un "scale factor" de 20.

La présence de méthylepentose a été détectée par la méthode de Dische et Shettles, (1948).

La masse moléculaire du polysaccharide a été évaluée de la même façon que dans la première partie (voir mat. et méth.) avec une seule colonne Ultrahydrogel.



Résultats et discussion

Sélection d'une souche et identification

Après étude complète de tous les microorganismes isolés dans les conditions déjà énoncées, 4 souches ont été retenues pour avoir affichées une augmentation de viscosité (fig. 6). Les microorganismes ont été identifiés par un laboratoire d'expertises. Ce sont tous des bacilles gram négatifs.

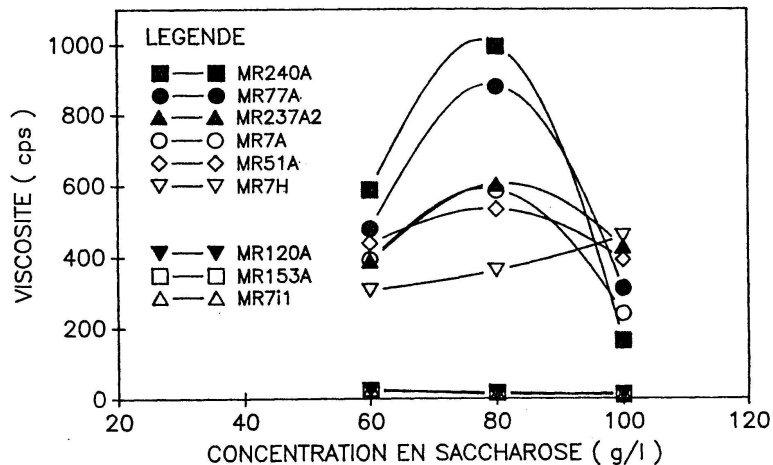


Figure 6 Mesure de la viscosité des milieux selon la concentration en saccharose, 30°C, 200 rpm, 4 jours.

Tableau 5 Identification des microorganismes pouvant produire du polysaccharide sur milieu à base de sirop d'érable.

Numéro	Identification	Provenance
MR51A et 77A	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Terre d'érablière
MR237A2 et 240A	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Eaux usées
MR7i, 120A et 153A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Feuilles, terre et eaux usées

Ces résultats sont la gracieuseté du Laboratoire de lutte contre la maladie de Santé et Bien Être Social Canada, Direction générale de la santé, Tunney's pasture, Ottawa (Ontario).

Une étude sur la présence de 6 désoxy-hexose avait été entreprise en parallèle, mais a dû être abandonnée car la souche qui avait réussi à produire près de 2 g.l⁻¹ de ce sucre rare a été identifiée comme un pathogène humain (tab.5). L'intérêt à produire du fucose ou du rhamnose, un 5-méthylpentose réside dans le fait que ces sucres précurseurs de saveurs se transigent à près de 200\$ U.S. du kilogramme.

Aucun microorganisme filant n'a été isolé à partir du sirop d'érable filant. On suppose que la formation du polymère surviendrait avant la réduction du sirop par ébullition. *Enterobacter agglomerans* a été la seule souche trouvée dans cette étude pouvant épaissir le MBSE.

Effet du saccharose et de l'extrait de levure

La meilleure production a été obtenue alors que le milieu était supplémenté avec 80 g.l⁻¹ de saccharose (fig.6) et 1.5 g.l⁻¹ d'extrait de levure (fig.8). Les viscosités étaient de l'ordre de 800 à 1000 cps pour *enterobacter agglomerans* (MR240A et MR77A). Les sources d'azote favorisant le plus l'apparition de filant étaient : l'extrait de levure avec près de 500 cps, suivi de la caséine avec 200 à 300 cps (fig.7). Cette observation se confirme à la fig.8 avec un rendement optimum lors de l'ajout de 1.5 à 2.0 g.l⁻¹ d'extrait de levure au MBSE ajusté à 80 g.l⁻¹ de saccharose.

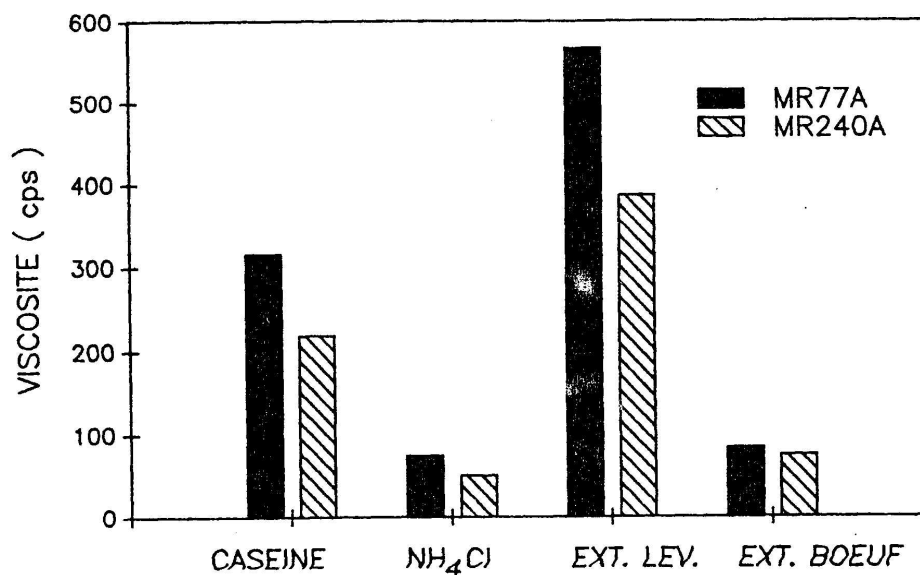


Figure 7 Mesure de la viscosité des milieux selon la source d'azote utilisée.

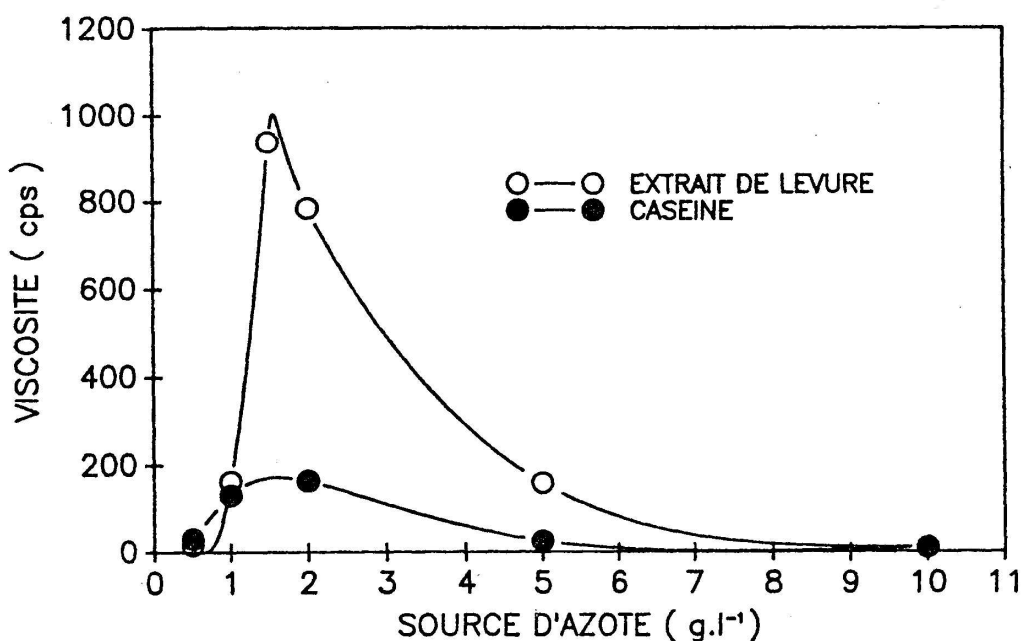


Figure 8 Mesure de la viscosité selon la source d'azote utilisée en fonction de sa concentration.

Effet du rapport C/N

L'effet du rapport C/N a été démontré en gardant constant les rapports de proportion du saccharose et de l'extrait de levure lorsque la quantité de saccharose varie. Ces rapports ont été déterminés en divisant la quantité d'azote contenu dans l'extrait de levure pour les rendements optimum déterminés dans les essais antérieurs soient : 80 g.l⁻¹ de saccharose et 1.0, 1.5 et 2.0 g.l⁻¹ d'extrait de levure, correspondant respectivement à C/N=218, 164 et 131. Les résultats à la fig. 9 tendent à démontrer que le rapport C/N=164 est le plus performant alors que le milieu contient 80 g.l⁻¹ de saccharose et 1.5 g.l⁻¹ d'extrait de levure. D'autres auteurs avaient déjà observé qu'un rapport C/N se traduisant par un excès en carbone ou

une déficience en azote favorisait la production de polysaccharides (Duguid et Wilkinson, 1953; Graber et al., 1998; Williams et Wimpenny, 1988; Congregado, 1985).

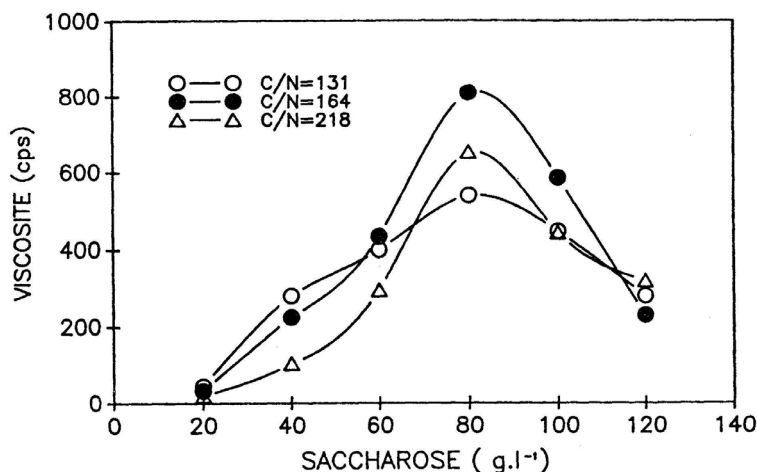


Figure 9 Effet du rapport C/N sur la viscosité des milieux à base de sirop d'érable fermentés par *Enterobacter agglomerans*.

Effet de la température

Il avait déjà été observé que la température avait un effet sur le rendement en polysaccharides (Duguid et Wilkinson, 1953; Graber et al., 1998; Williams et Wimpenny, 1977). Nous avons trouvé que les meilleurs rendements en viscosité se situaient à une température inférieure à la température optimale de croissance de *enterobacter agglomerans* soit entre 20 et 30° C (fig.10). Cet effet avait déjà été vérifié (Congregado et al., 1985; Manresa et al., 1987).

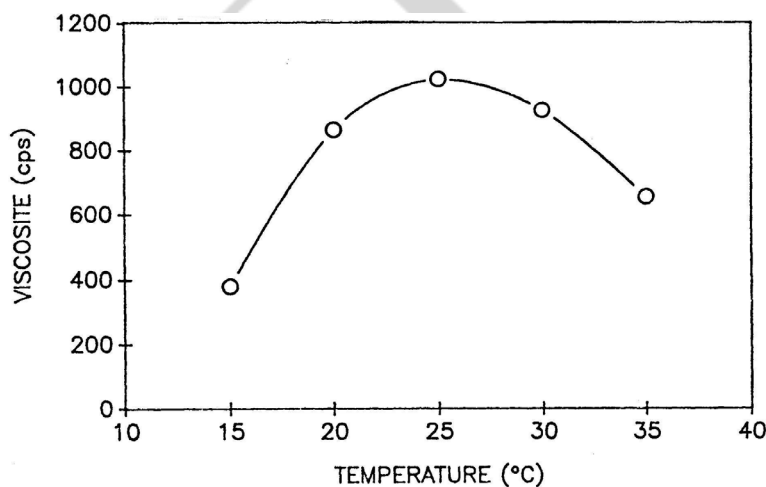


Figure 10 Effet de la température sur la viscosité des milieux à base de sirop d'érable fermentés par *Enterobacter agglomerans*.

Effet du pH

L'importance du pH sur le rendement en polysaccharide de diverses souches a été décrit par de nombreux auteurs (Congregado, 1985; Graber et al., 1988; Williams et Wilkinson, 1977). Généralement, la

production diminue sous un pH près de la neutralité pour s'estomper vers 5.0. Notre expérience confirme ces ouvrages alors que l'augmentation de la viscosité devient presque nulle à pH 5.0 (Fig.11). La valeur critique se situe à pH 6.5 au dessus de laquelle la viscosité diminue brusquement. On observe un plateau dans la zone située entre pH 6.5 et 8.0 où les viscosités se maintiennent relativement proches pour les températures de 20, 25 et 30°.

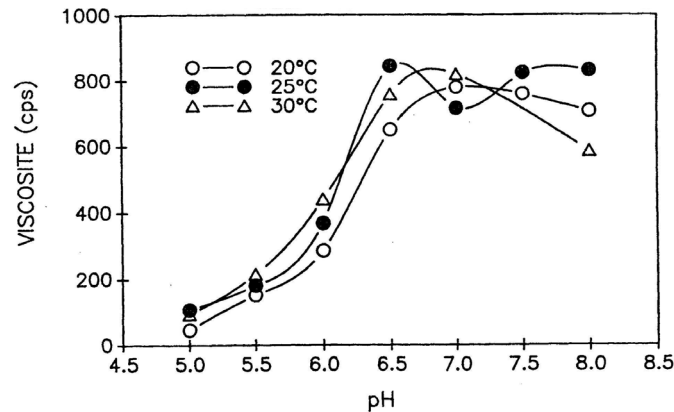


Figure 11 Effet du pH et de la température sur la viscosité des milieux à base de sirop d'érable fermentés par *Enterobacter agglomerans*.

Effet de la colonie

Nous avons tenté d'expliquer la raison des écarts de viscosités obtenus à certains moments de notre recherche par la mutation des colonies au cours des repiquages. Nous avonsensemencé en triplicata, 5 colonies distinctes à partir de pétris sur les milieux dans les conditions habituelles. Nos résultats semblent démontrer que la différenciation des cultures à partir d'une cellule mère ne soit pas à l'origine de ce changement (fig.12). Nous avons plutôt trouvé explication avec l'écart de l'agitation observé entre les incubateurs (+/-20 rpm).

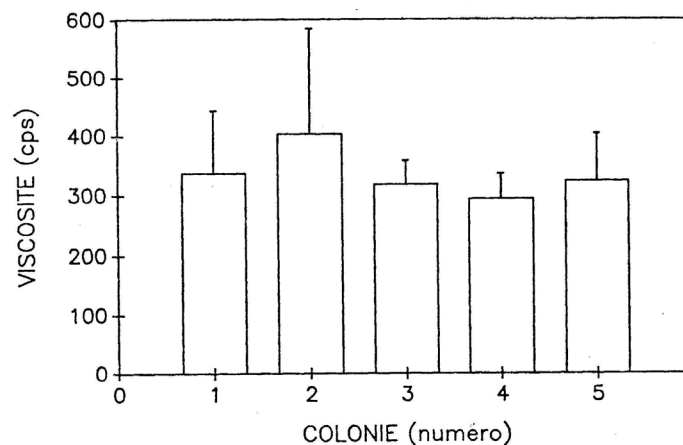


Figure 12 Effet de la colonie sur la viscosité des milieux à base de sirop d'érable ensemencés avec *Enterobacter agglomerans*.

Effet de l'agitation

L'agitation fait intervenir l'aération, donc la notion d'apport en oxygène. Comme la production des polysaccharide par *enterobacter agglomerans* est un phénomène aérobique, une meilleure dissolution de

l'oxygène entraîne une augmentation de la production du polymère. A ce stade, il a été possible d'accroître considérablement la production en agitant à 250 rpm ou 300 rpm faisant grimper la viscosité de 1000 cps à près de 3000 cps (fig. 13). Cette étape marque un tournant majeur dans notre étude.

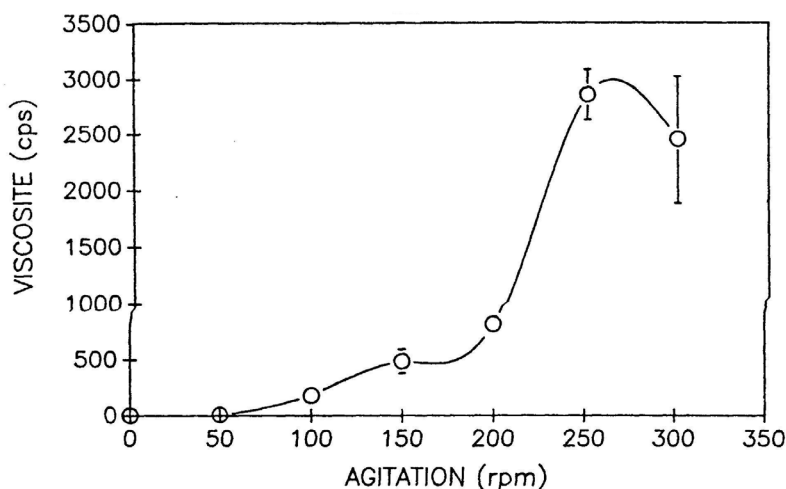


Figure 13 Effet de l'agitation sur la viscosité des milieux à base de sirop d'érableensemencés avec *Enterobacter agglomerans*.

Rendement

La fraction précipitable à l'alcool contenant le polysaccharide atteint son optimum autour de 72 heures (fig. 14) de production avec approximativement 21 g.l⁻¹ (fig. 15) de FPA, avec un taux d'humidité très faible de 1.11%. Les cendres représentaient 19.84% du contenu total de la FPA. Une mesure à l'anthrone révèle que la FPA est constituée de 40% de polysaccharides. À la fin de la fermentation, 31.96 g sur 76.18 g de saccharose demeuraient inutilisés (fig. 16) ce qui alloue 44.22 g de saccharose répartis entre les activités métaboliques des cellules et la production du polysaccharide. On peut calculer un taux de conversion (TC) de 13.22% du saccharose en polysaccharide de la façon suivante :

$$TC = \frac{\text{Quantité de saccharose utilisée}}{\text{Fraction précipitable à l'alcool} * \% \text{ en polysaccharide}} * 100\%$$

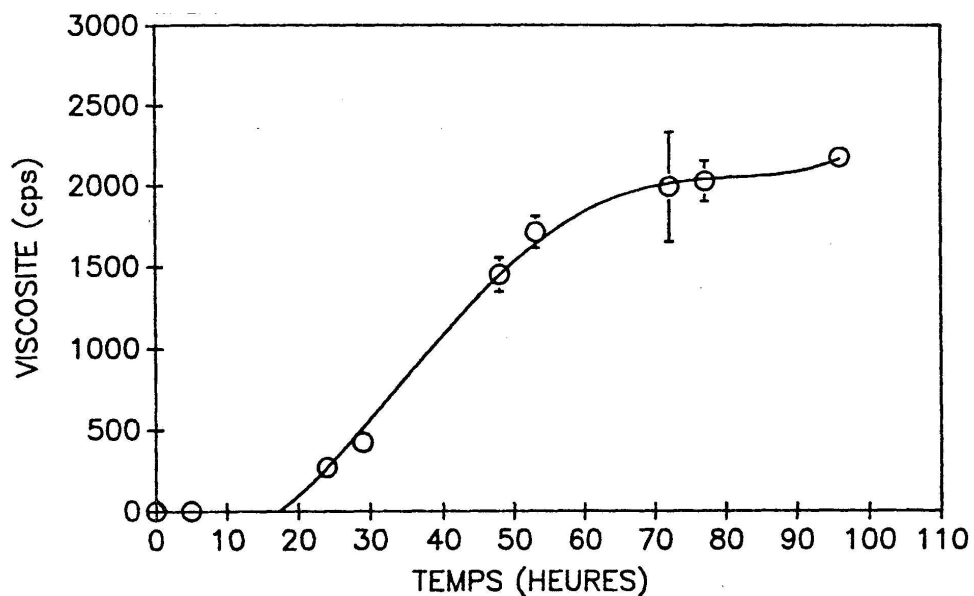


Figure 14 Évolution de la viscosité en fonction du temps selon les conditions optimales de production déterminées pour *Enterobacter agglomerans* sur un milieu à base de sirop d'érable.

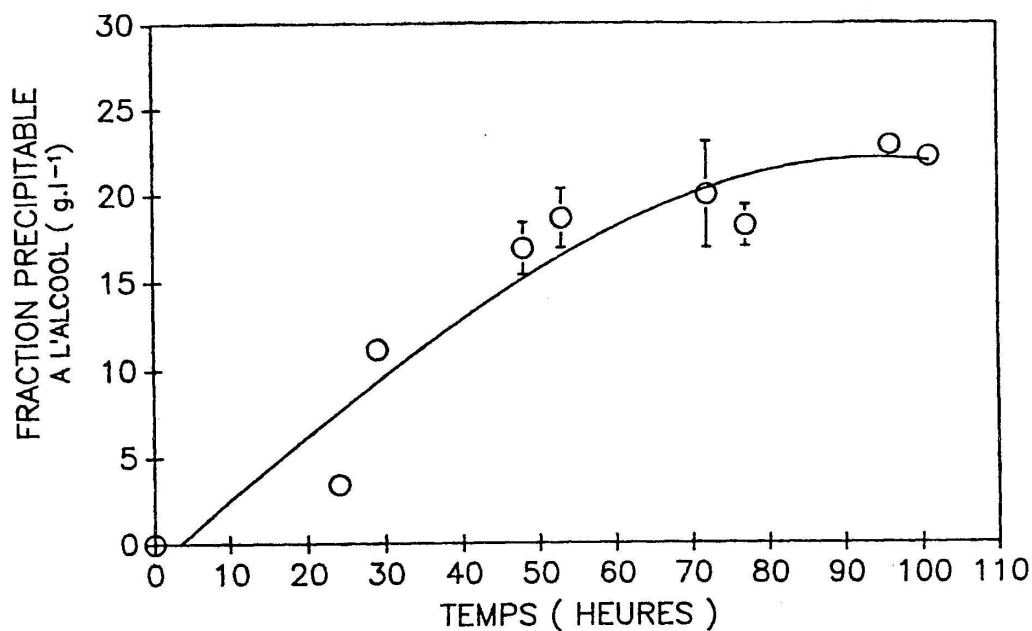


Figure 15 Taux d'utilisation du saccharose déterminé par hydrolyse enzymatique métabolisé par *Enterobacter agglomerans* dans les conditions optimum de croissance sur un milieu à base de sirop d'érable.

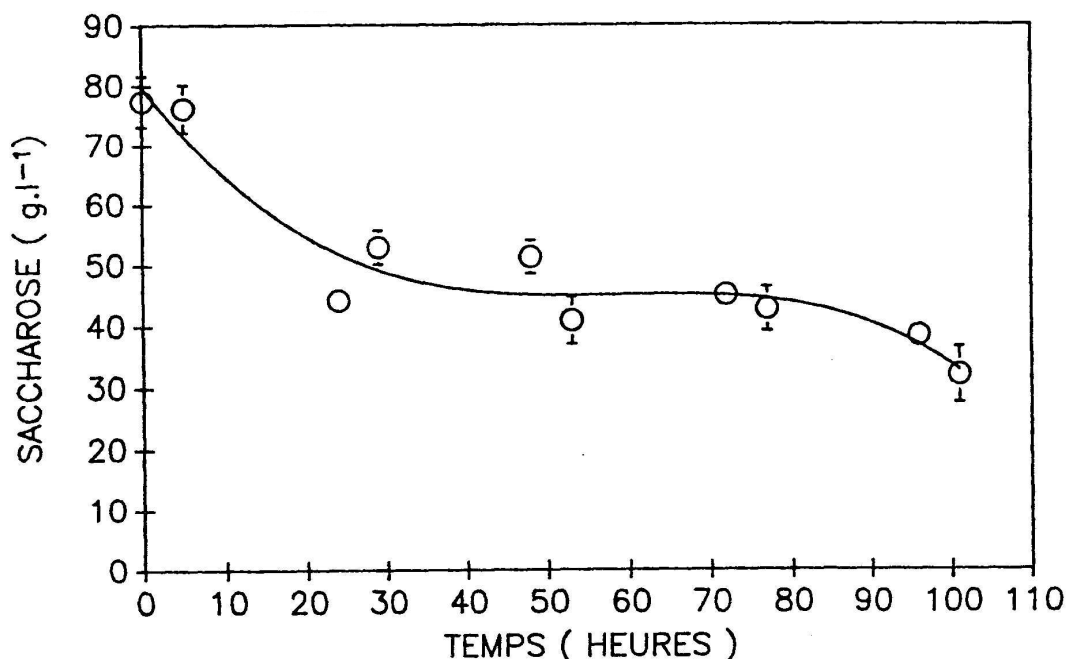


Figure 16 Taux d'utilisation du saccharose déterminé par hydrolyse enzymatique métabolisé par *Enterobacter agglomerans* dans les conditions optimum de croissance sur un milieu à base de sirop d'érable.

Caractérisation du polysaccharide obtenu

L'hydrolyse du polysaccharide a révélé la présence principalement du glucose et du galactose dans un rapport de 3:4. Le rhamnose et le fucose n'ont pas été identifiés malgré que certains auteurs affirmaient le contraire pour un polysaccharide naturel issu du sirop d'érable (Adams et al., 1959; Storz et al., 1985). Cependant, l'organisme responsable de la production n'a pas été identifié et rien ne prouve qu'il s'agisse du même que pour notre étude. Sur les chromatogrammes, il restait des sucres non identifiés et une fraction du polymère non hydrolysé.

Impacts scientifiques et économiques

Dans ce secteur, il y a beaucoup d'appelés mais peu d'élus. Ainsi, pour quelques dizaines de nouveaux polymères découverts, souvent un seul verra application dans l'alimentation. Grâce à l'optimisation de la production, nous avons démontré avec des viscosités de plus de 2000 cps, que nous pouvons croire à un avenir pour ce nouveau polymère, baptisé l'érablan, pour son potentiel épaississant. La production de l'érablan permettrait de revaloriser les sirops d'érable du Québec non commercialisables et viendrait ajouter une diversification et une juste concurrence dans le choix des gommes alimentaires d'origine bactérienne sur le marché, actuellement dominé par le xanthane.



Publication de l'auteur

Publication en projet, verra peut-être le jour dans :

J. of applied bactériology ou J. of biotechnology

Racine, M.; Morin A., et Dumont J., Production and characterization of a new polysaccharide, erablan, from *enterobacter agglomerans* on a none commercializable maple sirup based media.



Conclusion

Il a donc été possible de produire un polysaccharide sur un milieu à base de sirop d'érable non commercialisable grâce à *enterobacter agglomerans*. Le très grand potentiel de l'érablan en tant qu'agent épaississant mérite que des études plus poussées soient entreprises sur ses propriétés rhéologiques ainsi que sur celles de gélification et de stabilisation dans un futur rapproché. Selon la réponse du polymère, une étude en fermenteurs pilotes pourrait ensuite être envisagée simultanément avec une optimisation globale et finale des conditions de production de l'érablan.



Remerciements

Ces travaux de recherche ont été financés par le programme de l'Entente Canada-Québec (Agriculture Canada et le Ministère de l'agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec). Les auteurs désirent remercier le personnel technique du Centre de recherche et de développement sur les aliments pour leurs conseils et leur support scientifique.



Bibliographie Partie 1

- Bitter, T. et Muir, H.M.,(1962) A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Anal. Biochem.*,7,11:27-30
- Bullerman, L.B. et Berry, E.C.,(1966) Use of Cheese Whey for Vitamin B12 Production I. Whey Solids and Yeast Extract Levels. *Appl. Microbiol.*,14:353-355
- Cerning, J., Bouillane, C. Desmazeaud, M.J. et Landon M.,(1988) Exocellular Polysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Letters*,10,4:255-260
- Champagne, C.P., Baillargeon-Côté, C. et Goulet, J.,(1989) Whey Fermentation by Immobilized Cells of *Propionibacterium shermanii*. *J. of Appl. Bacteriol.*, 66:175-184
- Congregado, F. Estanol, I., Espuny, M.J., Fusté, M.C., Manresa, M.A., Marqués, A.M., Guinea, J. et Simon-Pujol, M.D.,(1985) Preliminary Studies on the Production and Composition of Polysaccharide Synthesized by *Pseudomonas* sp. EPS-5028. *Biotechnol. Letters.*,7,12:883-888
- Crow, V.L.(1988) Polysaccharide Production by *Propionibacteria* during Lactose Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 7:1892-1895
- Dische, Z. et Shettles, L.B.,(1948) A Specific Color Reaction of Methyl-pentoses and a Spectrophotometric Micromethod for their Determination. *J. Biol. Chem.* 175:595-603
- Duguid, J.P et Wilkinson, J.F.,(1953) The Influence of Cultural Conditions on Polysaccharide Production by *Aerobacter aerogenes*. *J. of Gen. Microbiol.* 9:174-189
- Duguid, J.P. et Wilkinson, J.F.,(1954) Note on the Influence of Potassium Deficiency upon Production of Polysaccharide by *Aerobacter Aerogenes*. *J. of Gen. Microbiol.*,2:71-73
- Goulet, J. (1977) Revue sur l'utilisation et la transformation du lactosérum de fromagerie. Agriculture Québec, SATIA
- Graber, M., Morin, A. Duchiron, F. et Monsan, P.F.,(1988) Microbial Polysaccharides Containing 6-deoxysugars. *Enzyme Microb. Technol.*,10,4:197-260
- Knutson, C.A. et Jeanes, A.,(1968) A New Modification of The Carbazole Analysis: Application to Heteropolysaccharides. *Anal. Biochem.*,24:470-481
- Manresa, A., Espuny, M. J., Guinea, J., Comelles, F.,(1987) Characterization and Production of a new Extracellular Polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,26:347-351
- Maury, A. et Roque, J.,(1986) Les polysaccharides. *Biofutur*, 8:17-31
- Morin, A., Duchiron, F. et Monsan, P.F.,(1987) Production and Recovery of Rhamnose-containing Polysaccharides from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J of Biotechnol.*,6:293-306
- Moulin, G. et Galzy, P. (1984) Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.*,1:347-373
- Reddy, M.S., Washam, C.J., Reinbold, G.W. et Vadamuthu, E.R., (1973) Immunogenic Properties of Slime from *Propionibacteria*. *J of Food Technol.*,36:200-201
- Shams, M.A. et Jaynes, H.O.,(1983) Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Corynebacterium* #98 in Cheese Whey Substrate. *J. of Food Sci.*,48:208-211
- Smith, I.H. et Pace, G.W.,(1982) Recovery of Microbial Polysaccharides. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*,32:119-121
- Williams, A.G. et Wimpenny, J.W.T., (1977) Exopolysaccharide Production by *Pseudomonas* NCIB11264, Grown in Batch culture. *J. of Gen. Microbiol.*, 102:13-21



Bibliographie Partie 2

- Adams, G.A., Bishop, C.T. et McDonald, I.J., Polysaccharides from the Sap of the Sugar Maple, *Can. J. of Biochem. and Physiol.*, 37, (1959), 507-510.
- Bitter, T. et Muir, H.M. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction, *Anal. Biochem.*, 7, 11, (1962), 27-30.
- Bullerman, L.B. et Berry, E.C. Use of Cheese Whey for Vitamin B12 Production I – Whey Solids and Yeast Extract Levels, *Appl. Microbiol.*, 14, (1966), 353-355.
- Cerning, J., Bouillane, C. Desmazeaud, M.J. et Landon, M., Exocellular Polysaccharide Production by *Streptococcus thermophilus*, *Biotechnol. Letters*, 10, 4, (1988), 255-260.
- Champagne, C.P., Baillargon-Côté, C. et Goulet, J., Whey Fermentation by Immobilized Cells of *Propionibacterium shermanii*, *J. of Appl. Bactériol.*, 66, (1989), 175-184.
- Congrégado, F. Estanol, I., Espuny, M.J., Fusté, M.C., Manresa, M.A., Marqués, A.M., Guinea, J. et Simon-Pujol, M.D., Preliminary Studies on the Production and Composition of Polysaccharide Synthesized by *pseudomonas* sp. EPS-5028, *Biotechnol. Letters.*, 7, 12, (1985), 883-888
- Conseil des productions végétales du Québec, Érablière – Le sirop d'érable filant, Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec, (1984).
- Crow, V.L., Polysaccharide Production by *Propionibacteria* during Lactose Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 7, (1988), 1892-1895.
- Dische, Z. et Shettles, L.B., A Specific Color Reaction of Methyl-pentoses and a Spectrophotometric Micromethod for their Determination, *J. Biol. Chem.* 175, (1948), 595-603.
- Duguid, J.P. et Wilkinson, J.F., The Influence of Cultural Conditions on Polysaccharide Production by *Aerobacter aerogenes*, *J. of Gen. Microbiol.* 9, (1953), 174-189.
- Duguid, J.P. et Wilkinson, J.F., Note on the Influence of Potassium Deficiency upon Production of Polysaccharide by *Aerobacter aerogenes*, *J. of Gen. Microbiol.*, 2, (1954), 71-73.
- Fabien, F.W. et Buskirk, H.H., *Aerobacter aerogenes* as a cause of Ropiness in Maple Sirup, *Industrial and Engineering Chemistry*, 27, 3, (1935), 349-350.
- Goulet, J., Revue sur l'utilisation et la transformation du lactosérum de fromagerie, Agriculture Québec, SATIA (1977).
- Graber, M., Morin, A. Duchiron, F. et Monsan, P.F., Microbial Polysaccharides Containing 6-déoxysugars, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 4, (1988), 197-260.
- Knutson, C.A. et Jeanes, A., A New Modification of the Carbazole Analysis : Application to Héteropolysaccharides, *Anal. Biochem.*, 24, (1968), 470-481.
- Manresa, A., Espuny, M. J., Guinea, J., Comelles, F., Characterization and Production of a new Extracellular Polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910, *Appl. Microbiol.* 26, (1987), 347-351.
- Maury, A. et Roque, J., Les polysaccharides. *Biofutur*, 8, (1986), 17-31.
- Morin, A., Duchiron, F. et Monsan, P.F., Production and Recovery of Rhamnose-containing Polysaccharides from *Acinetobacter calcoaceticus*, *J. of Biotechnol.*, 6, (1987), 293-306.
- Moulin, G. et Galzy, P. Whey, a Potentiel Substrate for Biotechnology. *Biotechnol. Gen. Engin. Rec.*, 1, (1984), 347-373.
- Reddy, M.S., Washam, C.J., Reinbold, G.W. et Vadamuthu, E.R., Immunogenic Properties of Slime from *Propionibacteria*, *J. of Food Technol.*, 36, (1973), 200-201.
- Shams, M.A. et Jaynes, H.O., Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Corynebacterium* #98 in Cheese Whey Substrate, *J. of Food Sci.*, 48, (1983), 208-211.
- Smith, I.H. et Pace, G.W., Recovery of Microbial Polysaccharides, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, (1982), 119-121.
- Storz G., Darvill, A.G. et Albersheim, P., Characterization of Polysaccharides Isolated from Maple Syrup, *Phytochem.*, 25, (1986), 437-441.
- Williams, A.G. et Wimpenny, J.W.T., Exopolysaccharide Production by *Pseudomonas* NCIB11264 Grown in Batch Culture, *J. of Gen. Microbiol.*, 102, (1977), 13-21.2.